

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/001262

International filing date: 08 February 2005 (08.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP

Number: 04003036.3

Filing date: 11 February 2004 (11.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 17 March 2005 (17.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

Europäisches
PatentamtEuropean
Patent OfficeOffice européen
des brevets

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

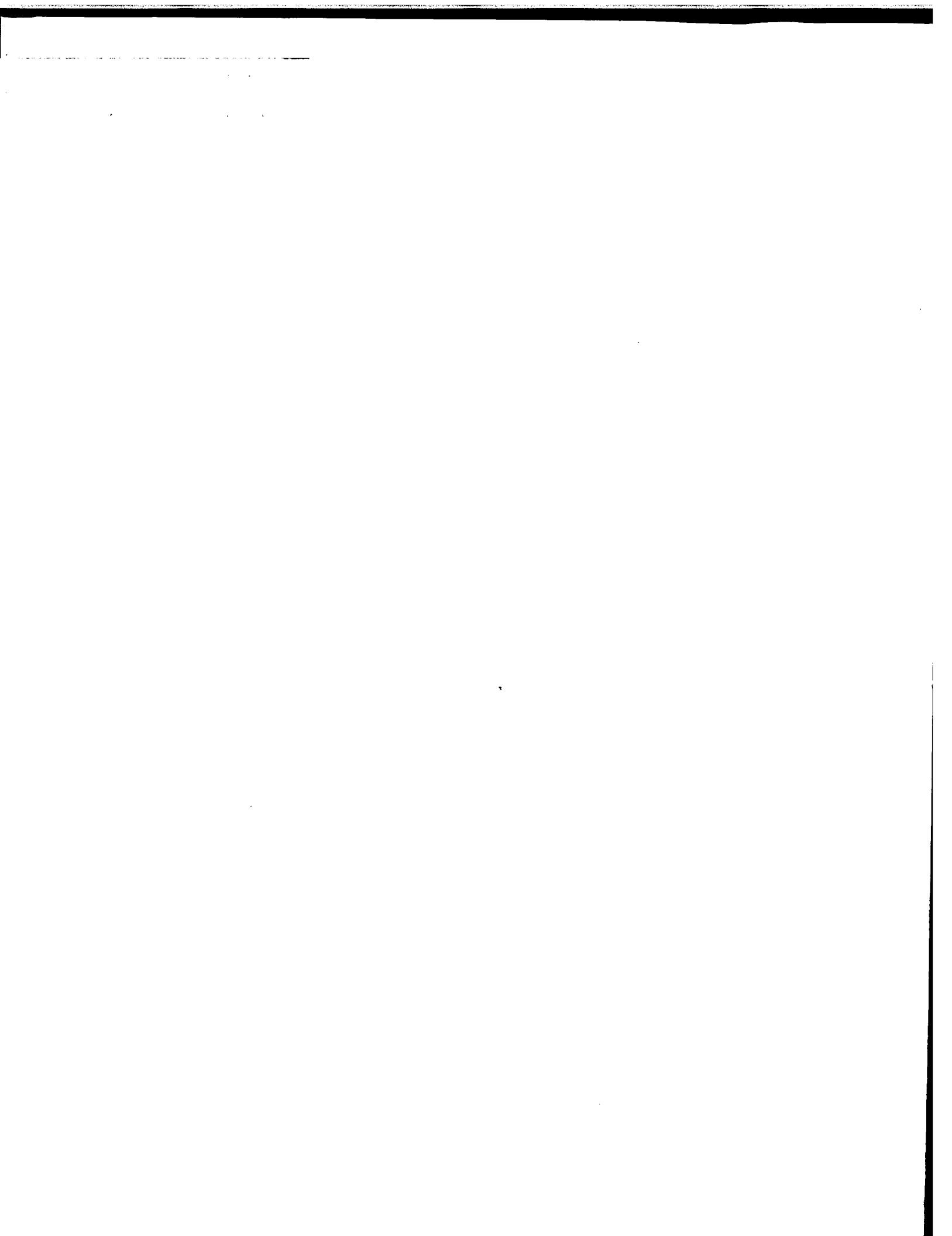
04003036.3

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk





08.02.05

Anmeldung Nr:

Application no.: 04003036.3

Demande no:

Anmelddetag:

Date of filing: 11.02.04

Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

UREA CASALE S.A.
Via Giulio Pocobelli, 6
6900 Lugano-Besso
SUISSE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

A culture medium for the production of filamentary fungi

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

C12N1/00

An Anmelddetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL
PT RO SE SI SK TR LI



Titolo: Mezzo di coltura per la produzione di funghi filamentosi

DESCRIZIONE

Campo di applicazione

La presente invenzione riguarda il settore tecnico degli agenti
5 fitosanitari.

In particolare, l'invenzione si riferisce ad un mezzo di coltura per funghi
filamentosi, più in particolare per funghi nematofagi.

Arte nota

10 L'utilizzo di microrganismi e in particolare di funghi come agenti
fitosanitari costituisce una pratica sempre più frequente.

Prodotti a base di funghi sono già commercializzati per la lotta contro
insetti, funghi fitopatogeni e altri parassiti delle colture agricole.

15 Ad esempio, nel brevetto US 5 811 092 sono descritti agenti nematofagi
per combattere nematodi dei generi *Meloidogyne*, *Hetherodera* e
Ditylenchus, costituiti da particolari ceppi di *Arthrobotrys conoides*
Dreschsler, un fungo filamentoso.

20 I succitati nematodi sono responsabili di gravi malattie a carico di
vegetali e funghi e causano perdite economiche ingentissime, poiché
portano alla compromissione di una percentuale di raccolto dell'ordine
del 50-70%.

25 L'utilizzo di funghi nematofagi, in alternativa agli usuali antiparassitari
chimici (ad es. bromuro di metile, tricloronitrometano, dicloropropene
ecc.) da applicare al terreno prima di iniziare la coltivazione o ai
carbammati applicati alle colture, consente di evitare gravi
inconvenienti, quali la sterilizzazione del terreno, la distruzione
dell'equilibrio ecologico e la potenziale tossicità verso l'uomo e gli
animali.

- 2 -

I funghi nematofagi sono pertanto particolarmente adatti ad essere utilizzati in coltivazioni di agricoltura biologica ma presentano tuttora un costo piuttosto elevato, conseguente alla difficoltà di produrli industrialmente con rese elevate.

5 E' dunque sentita l'esigenza di avere a disposizione funghi nematofagi per l'uso in agricoltura di costo meno elevato.

Il problema alla base della presente invenzione è stato quello di mettere a disposizione un mezzo di coltura per funghi filamentosi e in particolare per funghi nematofagi, che consentisse di produrre tali 10 microrganismi a livello industriale con rese elevate e tempi brevi, con conseguente diminuzione del costo del prodotto finale.

Sommario dell'invenzione

15 Un tale problema è stato risolto, secondo l'invenzione, da un mezzo di coltura per funghi filamentosi comprendente almeno una fonte di carbonio scelta dal gruppo costituito da melassa, estratto di malto e saccarosio e almeno una fonte di azoto organico scelta tra estratto di lievito e "corn steep liquor".

20 Preferibilmente la suddetta almeno una fonte di carbonio costituisce da 70 a 85% in peso del peso secco del mezzo di coltura e la suddetta almeno una fonte di azoto organico costituisce da 15 a 30% in peso del peso secco del mezzo di coltura.

25 Il mezzo di coltura secondo la presente invenzione può inoltre comprendere una fonte di azoto minerale, costituita da nitrati o sali d'ammonio. La suddetta fonte di azoto minerale viene generalmente aggiunta gradualmente al mezzo di coltura durante la crescita dei funghi in una quantità non superiore al 10% in peso del peso secco del mezzo di coltura e generalmente compresa fra 5 e 8% in peso.

30 Una composizione di mezzo di coltura preferita della presente invenzione è costituita da 75-85% estratto di malto e 15-25% estratto di lievito (le percentuali sono, come nel prosieguo della presente descrizione, in peso sul peso secco del mezzo di coltura).

Un altro mezzo di coltura preferito secondo l'invenzione comprende 60-65% di melassa, 10-15% di saccarosio, 10-15% di corn steep liquor e 10-15% di estratto di lievito. Vantaggiosamente tale mezzo di coltura contiene, in aggiunta, da 5 a 8% di una fonte di azoto minerale, in particolare idrogenofosfato di diammonio.

Un ulteriore mezzo di coltura preferito secondo la presente invenzione contiene due sorgenti di carbonio, ovvero estratto di malto, in quantità del 25-30%, e melassa, in quantità del 40-45%, nonché corn steep liquor, in quantità del 25-30%.

10 Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione sarà ulteriormente descritta facendo riferimento ad alcuni esempi di realizzazione forniti a titolo illustrativo e non limitativo.

15 Prima di procedere con l'illustrazione degli esempi, si ritiene utile fornire alcune precisazioni circa i componenti del mezzo di coltura secondo l'invenzione.

Quali fonti di carbonio si utilizzano l'estratto di malto e/o la melassa e/o il saccarosio.

20 L'estratto di malto è ottenuto per germinazione di chicchi di cereali (generalmente orzo). Al momento della germinazione vengono prodotti particolari enzimi (amilasi), che permettono la trasformazione dell'amido in zuccheri. L'estratto di malto contiene circa 60% di maltosio, vitamine e numerosi oligoelementi.

25 La melassa costituisce un sottoprodotto dell'industria zuccheriera e si presenta sotto forma di un liquido viscoso bruno-nero, contenente 10% di acqua, 35% di saccarosio, 20% di altri zuccheri e 15% di ceneri.

Quali fonti di azoto organico si utilizzano l'estratto di lievito e il corn steep liquor.

L'estratto di lievito è ottenuto per autolisi di *Saccharomyces cerevisiae* e

- 4 -

5 si presenta sotto forma di polvere fine di colore giallo pallido, facilmente solubile in acqua. L'estratto di lievito contiene peptidi, amminoacidi liberi, basi puriniche e pirimidiniche, nonché vitamine idrosolubili del gruppo B. L'estratto di lievito ha un contenuto di azoto totale del 10% e un contenuto di azoto a-amminico del 5%.

10 Il corn steep liquor è ottenuto mediante macerazione dei chicchi di mais a 50°C per 24-48 ore in acqua contenente anidride solforosa. Quest'ultimo reagente consente di disorganizzare il reticolo proteico che circonda i granuli d'amido e offre il vantaggio di impedire lo sviluppo di 15 microrganismi indesiderati durante la macerazione. Il corn steep liquor ha un contenuto di azoto totale del 7% ed un contenuto di azoto a-amminico dell'1,7% e contiene altresì 5% di zuccheri, 4% di potassio, 3% di fosforo e 17% di minerali diversi.

15 Sono stati sperimentati diversi mezzi di coltura basati sulle fonti di carbonio e di azoto sopra citate. Questi mezzi possono essere classificati nelle seguenti tre serie:

- serie 1: mezzi aventi come fonte principale di carbonio l'estratto di malto;
- serie 2: mezzi aventi come fonte principale di carbonio la melassa;
- 20 - serie 3: mezzi in cui la fonte principale di carbonio è costituita da estratto di malto e melassa.

25 Il contenuto percentuale della fonte di azoto organico dei mezzi secondo l'invenzione può essere diminuito, sostituendo parte di tale fonte di azoto organico con una fonte di azoto inorganico (nitrati o composti d'ammonio), che viene aggiunta gradualmente in piccole quantità durante la coltura.

Quest'aggiunta di azoto inorganico in corso di coltura consente una migliore nutrizione del microrganismo e, nel caso del fungo filamentoso, un rafforzamento dei filamenti miceliali.

30 La sostituzione di parte della fonte di azoto organico con una fonte di

- 5 -

azoto inorganico presenta anche il vantaggio di comportare una diminuzione dei costi di produzione, poiché le fonti di azoto organico (estratto di lievito e corn steep liquor) costituiscono il componente più costoso del mezzo di coltura secondo l'invenzione.

5 Il mezzo di coltura secondo l'invenzione è particolarmente adatto ad essere utilizzato per la produzione di funghi filamentosi della famiglia dei Moniliales. In particolare, negli esempi sotto indicati sono stati utilizzati funghi filamentosi di *Arthrobotrys conoides* Dreschsler.

ESEMPIO 1

10 Si tratta di un mezzo di coltura della serie 1.

La coltura del fungo filamentoso è stata eseguita in Erlen da 300 ml, contenente 150 ml di mezzo di coltura.

15 Il mezzo era costituito da 20 g/l di estratto di malto e 4 g/l di estratto di lievito ed era stato sterilizzato prima di essere seminato con conidi del fungo in questione.

La coltura è stata protratta per 6 giorni dalla semina ad una temperatura di circa 27°C.

20 A partire dal terzo giorno sono stati effettuati prelievi di campioni del mezzo di coltura per determinare la massa secca (g/l) e il numero di propagoli (CFU/l). Per determinare la massa secca, 20 ml del mezzo di coltura sono stati filtrati e poi portati a secco in stufa a 100°C per 24 ore. Il numero di propagoli è stato determinato su 1 ml di mezzo di coltura.

Si sono ottenuti i risultati riassunti nella seguente tabella 1

25

Tabella 1

giorno	pH	Massa secca (g/l)	CFU/l
0	6	0	0,00

- 6 -

3	5,26	1,505	1,92·10 ⁸
4	5,79	3,345	1,30·10 ⁹
5	6,56	5,05	3,07·10 ⁹
6	6,11	9,895	4,43·10 ⁹

ESEMPIO 2

La prova dell'esempio 1 è stata ripetuta in un minireattore da 2 litri con 1,2 litri del mezzo di coltura di cui all'esempio 1. Le condizioni sperimentali sono state le stesse dell'esempio 1, con l'unica differenza che i prelievi dei campioni sono iniziati già il giorno successivo alla semina dei conidi.

Il minireattore in questione è un contenitore con fondo bombato, provvisto di agitatore a pale, di mezzi di riscladamento e di raffreddamento, di mezzi per insuflare aria, nonché di sonde per la rilevazione di pH, O₂ e temperatura.

Sono stati ottenuti i risultati riassunti nella seguente tabella 2.

Tabella 2

Giorno	pH	Massa secca (g/l)	CFU/l
0	6	0	0,00
1	5,51	1,175	2,50·10 ⁶
2	5,5	1,3825	1,80·10 ⁷
3	6,61	1,59	8,50·10 ⁷
4	5,4	4,03	9,60·10 ⁸
5	5,13	4,29	1,27·10 ⁹

- 7 -

6	5,08	5,625	3,10·10 ⁹
7	5,5	7,848	6,08·10 ⁹

Al termine di sette giorni di coltura si ottengono dunque quasi 8 grammi di funghi per litro di mezzo di coltura con un numero di propagoli di $6,08 \cdot 10^9$.

ESEMPIO 3

5 Si tratta di una prova realizzata con un mezzo di coltura della serie 2.

La coltura del fungo filamentoso è stata eseguita in Erlen da 300 ml, contenente 150 ml di mezzo di coltura.

10 Il mezzo era costituito da 25 g/l di melassa, 5 g/l di saccarosio, 5 g/l di corn steep liquor e 5 g/l di estratto di lievito ed era stato sterilizzato prima di essere seminato con conidi del fungo in questione.

La coltura è stata protratta per 6 giorni dalla semina ad una temperatura di circa 27°C.

15 A partire dal terzo giorno sono stati effettuati prelievi di campioni del mezzo di coltura per determinare la massa secca (g/l) e il numero di propagoli (CFU/l). Per determinare la massa secca, 20 ml del mezzo di coltura sono stati filtrati e poi portati a secco in stufa a 100°C per 24 ore. Il numero di propagoli è stato determinato su 1 ml di mezzo di coltura.

Si sono ottenuti i risultati riassunti nella seguente tabella 3

20

Tabella 3

giorno	pH	Massa secca (g/l)	CFU/l
0	5,07	0	0,00
3	4,87	1,58	3,12·10 ⁷

- 8 -

4	4,20	3,82	$1,40 \cdot 10^8$
5	6,46	6,76	$1,30 \cdot 10^9$
6	6,98	9,995	$3,65 \cdot 10^9$

ESEMPIO 4

5 La prova dell'esempio 3 è stata ripetuta nel minireattore da 2 litri descritto nell'esempio 2, con 1,2 litri del mezzo di coltura di cui all'esempio 3. Le condizioni sperimentali sono state le stesse dell'esempio 3, con l'unica differenza che i prelievi dei campioni sono iniziati già il giorno successivo alla semina dei conidi.

Sono stati ottenuti i risultati riassunti nella seguente tabella 4:

Tabella 4

Giorno	pH	Massa secca (g/l)	CFU/1
0	5,07	0	0,00
1	5,04	2,675	$9,90 \cdot 10^7$
2	5,01	3,9	$3,00 \cdot 10^8$
3	5,44	5,125	$5,00 \cdot 10^8$
4	6,11	8,295	$8,20 \cdot 10^8$
5	6,69	2,75	$1,07 \cdot 10^9$
6	7,32	3,485	$2,10 \cdot 10^9$
7	7,65	10,164	$3,77 \cdot 10^9$

10 I risultati riportati per i giorni dal quinto in poi possono apparire

- 9 -

anomali ma ciò è dovuto soltanto ad un'eccessiva concentrazione di funghi nel mezzo di coltura, che non permette più di effettuare prelievi omogenei.

L'ultimo prelievo è stato effettuato direttamente nel reattore.

5 Si ottengono in questo caso, in sette giorni, oltre 10 grammi di funghi per litro di mezzo di coltura con un contenuto di propagoli di $3,77 \cdot 10^9$.

ESEMPIO 5

Si tratta di una prova realizzata con un mezzo di coltura della serie 3.

10 La coltura del fungo filamentoso è stata eseguita in Erlen da 300 ml, contenente 150 ml di mezzo di coltura.

Il mezzo era costituito da 15 g/l di melassa, 10 g/l di estratto di malto e 10 g/l di corn steep liquor ed era stato sterilizzato prima di essere seminato con conidi del fungo in questione.

15 La coltura è stata protratta per 6 giorni dalla semina ad una temperatura di circa 27°C.

A partire dal terzo giorno sono stati effettuati prelievi di campioni del mezzo di coltura per determinare la massa secca (g/l) e il numero di propagoli (CFU/l). Per determinare la massa secca, 20 ml del mezzo di coltura sono stati filtrati e poi portati a secco in stufa a 100°C per 24 ore. Il numero di propagoli è stato determinato su 1 ml di mezzo di coltura.

Si sono ottenuti i risultati riassunti nella seguente tabella 5

Tabella 5

Giorno	ph	Massa secca (g/l)	CFU/l
0	4,7	0	0,00

- 10 -

3	4,49	1,82	$2,38 \cdot 10^7$
4	4,62	3,815	$1,78 \cdot 10^8$
5	5,25	5,57	$1,23 \cdot 10^9$
6	6,03	8,555	$1,35 \cdot 10^9$

ESEMPIO 6

La prova dell'esempio 5 è stata ripetuta nel minireattore da 2 litri descritto nell'esempio 2, con 1,2 litri del mezzo di coltura di cui all'esempio 5. Le condizioni sperimentali sono state le stesse dell'esempio 5, con l'unica differenza che i prelievi dei campioni sono iniziati già il giorno successivo alla semina dei conidi.

Sono stati ottenuti i risultati riassunti nella seguente tabella 6:

Tabella 6

Giorno	pH	Massa secca (g/l)	CFU/l
0	4,7	0	0,00
1	4,61	2,905	$5,60 \cdot 10^6$
2	4,7	3,085	$6,00 \cdot 10^7$
3	4,56	3,265	$1,23 \cdot 10^8$
4	6,11	5,295	$3,20 \cdot 10^8$
5	5,99	5,88	$7,00 \cdot 10^8$
6	6,94	6,305	$9,50 \cdot 10^8$
7	7	10,026	$2,22 \cdot 10^9$

Sono stati dunque ottenuti, in sette giorni, oltre 10 grammi di funghi

- 11 -

per litro di mezzo di coltura con un contenuto di propagoli di $2,22 \cdot 10^9$.

ESEMPIO 7

Il mezzo di coltura dell'esempio 3 è stato modificato come segue, in maniera tale da ridurre il contenuto delle due fonti di azoto organico, 5 che costituiscono i componenti più costosi:

25 g/l di melassa;

5 g/l di saccarosio;

2,5 g/l di corn steep liquor;

2,5 g/l di estratto di lievito.

10 Con tale mezzo di coltura è stato eseguito un test (A) di coltura del fungo summenzionato, in confronto con altri due test (B e C) di coltura, in cui è stato utilizzato lo stesso mezzo di coltura ma si è proceduto ad aggiunte successive di una fonte di azoto minerale, a partire dal quarto giorno.

15 Nel test B sono stati aggiunti 0,21 g di idrogenofosfato di diammonio per 3 volte a partire dal quarto giorno (precisamente al quarto, sesto e ottavo giorno), per un'aggiunta totale di 0,63 g, e nel test C ne sono stati aggiunti 0,28 g per tre volte, sempre a partire da quarto giorno (precisamente al quarto, sesto e ottavo giorno), per un'aggiunta totale di 20 0,84 g.

Le prove sono state condotte in Erlen da 500 ml, contenenti 300 ml di mezzo di coltura, sterilizzato prima della semina dei conidi.

Al nono e ultimo giorno di coltura, il contenuto d'azoto totale del mezzo di coltura tal quale (A) era pari a 0,85 g/l mentre nei mezzi addizionati 25 di idrogenofosfato di diammonio (A e B) era pari rispettivamente a 1,05 g/l (A) e 1,26 g/l (B).

A partire dal terzo giorno sono stati effettuati, ogni due giorni, prelievi di campioni del mezzo di coltura per determinare la massa secca (g/l) e il

- 12 -

numero di propagoli (CFU/l). Per determinare la massa secca, 20 ml del mezzo di coltura sono stati filtrati e poi portati a secco in stufa a 100°C per 24 ore. Il numero di propagoli è stato determinato su 1 ml di mezzo di coltura.

5 Sono stati ottenuti i risultati riassunti nella seguente tabella 7:

Tabella 7

Giorno	A	A	A	B	B	B	C	C	C
	pH	MS	CFU	pH	MS	CFU	pH	MS	CFU
0	5,06	0,00	0,00	5,06	0,00	0,00	5,09	0,00	0,00
3	4,92	3,94	$5,50 \cdot 10^6$	4,80	2,84	$2,50 \cdot 10^4$	4,80	3,36	$2,50 \cdot 10^4$
5	5,12	3,44	$1,75 \cdot 10^8$	4,89	4,57	$4,73 \cdot 10^8$	5,30	3,48	$3,05 \cdot 10^8$
7	6,68	6,45	$1,58 \cdot 10^9$	5,47	8,32	$3,15 \cdot 10^9$	6,39	5,48	$4,00 \cdot 10^9$
9	7,14	8,63	$3,20 \cdot 10^9$	5,44	11,30	$7,25 \cdot 10^9$	5,86	7,86	$6,78 \cdot 10^9$

MS = massa secca (g/l).

CFU = propagoli/litro.

10 Come si nota dalla tabella sopra riportata, l'aggiunta di una fonte di azoto minerale, soprattutto quando si tratta di una piccola quantità (test B) consente di ottenere un considerevole aumento della massa secca dal settimo giorno di coltura e più del 100% di aumento del numero di propagoli a parità di tempo di coltura.

RIVENDICAZIONI

1. Mezzo di coltura per funghi filamentosi comprendente almeno una fonte di carbonio scelta dal gruppo costituito da melassa, estratto di malto e saccarosio e almeno una fonte di azoto organico scelta tra estratto di lievito e "corn steep liquor".
- 5
2. Mezzo di coltura secondo la rivendicazione 1, in cui detta almeno una fonte di carbonio costituisce da 70 a 85% in peso del peso secco del mezzo di coltura e detta almeno una fonte di azoto organico costituisce da 15 a 30% in peso del peso secco del mezzo di coltura.
- 10
3. Mezzo di coltura secondo la rivendicazione 1 o 2, comprendente ulteriormente una fonte di azoto minerale.
- 15
4. Mezzo di coltura secondo la rivendicazione 3, in cui detta fonte di azoto minerale è contenuta in una quantità non superiore al 10% in peso del peso secco del mezzo di coltura e preferibilmente compresa fra 5 e 8% in peso.
- 5
5. Mezzo di coltura secondo la rivendicazione 3 o 4, in cui detta fonte di azoto minerale è costituita da nitrati o sali d'ammonio.
- 6
6. Mezzo di coltura secondo una qualunque delle rivendicazioni 1 e 2, costituito da 75-85% estratto di malto e 15-25% estratto di lievito, in cui dette percentuali sono in peso sul peso secco di detto mezzo di coltura.
- 20
7. Mezzo di coltura secondo la rivendicazione 1 o 2, comprendente 60-65% di melassa, 10-15% di saccarosio, 10-15% di corn steep liquor e 10-15% di estratto di lievito.
- 25
8. Mezzo di coltura secondo la rivendicazione 7, comprendente ulteriormente da 5 a 8% di una fonte di azoto minerale.
9. Mezzo di coltura secondo la rivendicazione 8, in cui detta fonte di azoto minerale è costituita da idrogenofosfato di diammonio.

- 14 -

10. Mezzo di coltura secondo la rivendicazione 1 o 2, contenente, in percentuale in peso sul peso secco di detto mezzo, 25-20% di estratto di malto, 40-45% di melassa, e 25-30% di corn steep liquor.

11. Metodo per produrre su scala industriale funghi filamentosi, in particolare funghi nematofagi, comprendente la fase di seminare conidi di detti funghi in un mezzo di coltura secondo una qualunque delle rivendicazioni 1 o 2 e mantenere detto mezzo di coltura a temperatura di 23-30°C per un tempo di 5-10 giorni per determinare la riproduzione e la crescita dei funghi.

10 12. Metodo secondo la rivendicazione 11, comprendente la fase ulteriore di aggiungere gradualmente, preferibilmente a partire dal quarto giorno dalla semina di detti conidi, piccole quantità di una fonte di azoto minerale.

15 13. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui detta fonte di azoto minerale è costituita da nitrati o sali d'ammonio ed è aggiunta in quantità complessiva non superiore al 10% del peso secco di detto mezzo di coltura e preferibilmente in quantità compresa fra 5 e 8% del peso secco di detto mezzo di coltura.

- 15 -

RIASSUNTO

E' descritto un mezzo di coltura per funghi filamentosi comprendente almeno una fonte di carbonio scelta dal gruppo costituito da melassa, 5 estratto di malto e saccarosio e almeno una fonte di azoto organico scelta tra estratto di lievito e "corn steep liquor"; è descritto inoltre un metodo per produrre su scala industriale funghi filamentosi, in particolare funghi nematofagi, comprendente la fase di seminare conidi di tali funghi nel succitato mezzo di coltura e mantenere tale mezzo di 10 coltura a temperatura di 23-30°C per un tempo di 5-10 giorni per determinare la riproduzione e la crescita dei funghi.

